

# Groundnut cultivars with seed resistant to invasion by *Aspergillus flavus* (1)

V. K. MEHAN, D. Mc DONALD, S. N. NIGAM and B. LALITHA (2)

**Summary.** — One Indian commercial cultivar J 11 and two groundnut lines PI 337409 and PI 337394 F were found resistant to invasion and colonisation by *A. flavus* of intact, dried seeds when these were rehydrated and inoculated with Indian strains of the fungus. Storage of seeds for periods of 55, 70 and 90 days before testing did not significantly affect the results. Inoculation of seeds of seven cultivars with three different toxigenic strains of *A. flavus* showed marked differences in invasive potential between cultivars. The strain NRRL 3000 was less virulent than the other two on all cultivars. The cultivar J 11, which also shows resistance to pod rots, could be useful in areas where aflatoxin contamination is a serious problem.

## INTRODUCTION

Contamination of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds with aflatoxins is a serious problem in many parts of the world. The aflatoxins, which are produced by some strains of the fungus *Aspergillus flavus* Link ex-Fr., have been shown toxic to and carcinogenic in many animal species and constitute a real hazard to human health. In groundnut growing countries with advanced agriculture such as the U.S.A. it has been possible to reduce aflatoxin levels in produce by following recommended methods of growing, harvesting, drying and storing the crop designed to reduce *A. flavus* invasion and aflatoxin production. However, from the continued high levels of contamination reported it would appear that farmers in the developing countries have not yet adopted these recommendations [Stoloff, 1977]. Other possible means of avoiding contamination have to be explored and one of these is the utilisation of genetic resistance.

Groundnuts may be invaded by *A. flavus* before harvest, during post-harvest drying, or during storage if the produce is wetted [Auswick and Ayerst, 1963; Diener *et al.*, 1969; McDonald and Harkness, 1963]. There are no reports of significant varietal differences in resistance to *A. flavus* invasion before harvest or during crop drying, but differences in resistance to invasion of dry stored seed have been demonstrated [Laprade and Bartz, 1972; Mixon and Rogers, 1973]. This paper reports on some screening of groundnut cultivars and breeding lines for seed resistance to *A. flavus* invasion.

## MATERIALS AND METHODS

### Source of seed.

Seeds of cultivars for testing were obtained from the 1978 crops at the ICRISAT centre, and Gujarat Agricultural University, Junagadh, Gujarat State of India and from the 1979 crop at ICRISAT. The crops were grown in the rainy seasons and were not subjected to drought stress.

Cultivars were harvested at optimum maturity, dried for 3 days in windrows, hand picked, and pods sun-dried on mats until seed moisture content was below 7 percent. The pods were then stored in cloth bags in the laboratory until required for testing. The cultivars used are described in Table I.

### *Aspergillus flavus* strains.

Three strains of *A. flavus* were used in the various trials, AF 8-3-2A and AF 8-2 which produced aflatoxin B1 and NRRL 3000 which produced aflatoxins B1 and G1 [Mehan, unpublished data]. The strains were cultured on Czapek Dox Agar medium. Conidia were harvested from 8-day old cultures by flooding them with sterilized distilled water containing 5 p. 100 (v/v) Tween 20 and gently scraping the surface of the culture with a sterile needle to dislodge them. The conidial suspension was adjusted to contain  $4 \times 10^6$  conidia per ml.

### Seed resistance test.

The test method was basically that described by Mixon and Rogers [1973] with some modifications that have been described in detail elsewhere [Mehan and McDonald, 1980]. Only undamaged, mature, full-sized seeds which had been carefully removed from clean, undamaged pods were used in the tests. Each sample consisted of approximately 20 g of seeds surface sterilized with 0.1 p. 100 mercuric chloride which were placed in a sterile 9 cm diameter Petri-dish and sterile distilled water added to raise seed moisture content to 20 percent. To each sample, 1 ml of conidial suspension was added and the dish gently agitated to disperse the suspension over seed surfaces. Duplicate samples were treated in the same way except that sterile distilled water replaced the conidial suspension. All dishes were incubated at 25 °C for 8 days. They were then checked for the presence of sporulating colonies of *A. flavus* on the seeds. The percentages of seeds colonised were recorded. Cultivars with upto 15 p. 100 of seeds colonised were regarded as resistant to invasion and colonisation by *A. flavus*, those with 16-30 p. 100 colonised as moderately resistant, those with 31-50 p. 100 colonised as susceptible, and those with over 50 p. 100 colonised were highly susceptible [Mehan and McDonald, 1980].

(1) Submitted as Journal Article No. 167 by the International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru P.O. A.P. 502 324 (India).

(2) Groundnut Improvement Program, ICRISAT, Patancheru P.O. A.P. 502 324 (India).

TABLE I. — Groundnut cultivars tested (*Cultivars d'arachide testés*)

	Botanical type (botanique)	Seed coat (*) colour (couleur de la graine)	Comments	(Remarques)
PI 337409	Valencia	dark salmon (saumon foncé)	From Argentina. Resistant to <i>A. flavus</i> invasion of seed. [Mixon, Rogers, 1973]	d'Argentine. Résistant à l'invasion de la graine par <i>A. flavus</i> .
PI 337394F	Valencia	dark salmon (saumon foncé)	From Argentina. Resistant to <i>A. flavus</i> invasion of seed. [Mixon, Rogers, 1973]	d'Argentine. Résistant à l'invasion de la graine par <i>A. flavus</i> .
PI 259747	Valencia	plum purple (rouge prune)	From Peru. Resistant to rust. [Mazzani, Hinojosa, 1961]	du Pérou. Résistant à la rouille.
EC 76446(292)	Valencia	plum purple (rouge prune)	From Uganda. Resistant to rust and late leaf spot. [Subrahmanyam et al., 1980]	d'Ouganda. Résistant à la rouille et à la cercosporiose tardive.
TMV-2	Spanish	light salmon (saumon clair)	From India. Released cultivar.	de l'Inde. Cultivar vulgarisé.
J 11	Spanish	salmon (saumon)	From India. Released cultivar. Resistant to aflatoxin production. [Tulpule et al., 1977]	de l'Inde. Cultivar vulgarisé. Résistant à la production d'aflatoxine.
OG 43-4-1	Spanish	dull white (blanc cassé)	From India. Highly susceptible to <i>A. flavus</i> invasion of seed.	de l'Inde. Hautement sensible à l'invasion de la graine par <i>A. flavus</i> .
Florunner	Virginia	tan (brun moyen)	From USA. Moderately resistant to seed invasion by <i>A. flavus</i> . [Mixon, Rogers, 1973]	des E.U. Modérément résistant à l'invasion de la graine par <i>A. flavus</i> .
Samrala	Virginia	tan (brun moyen)	From India. Commonly grown cultivar in Gujarat.	de l'Inde. Cultivar croissant communément au Gujarat.
Asiriya Mwitunde	Virginia	reddish brown (brun rougeâtre)	From Tanzania. Tolerant to aflatoxin production. [Kulkarni et al., 1967]	de Tanzanie. Tolérant à la production d'aflatoxine.
US 26	Spanish	pale tan (brun clair)	Resistant to aflatoxin production. [Rao, Tulpule, 1967]	Résistant à la production d'aflatoxine.

(\*) As per (*d'après*) the Royal Horticultural Society, London, Colour Chart.

For each cultivar, in all the trials, 3 samples were tested for resistance to *A. flavus* invasion and 2 uninoculated samples were incubated to obtain a measure of natural infection. The 1979 inoculated seed results were analysed as a two factor, factorial design.

#### Trial with 1978 rainy season seeds.

Seeds of 2 cultivars from Junagadh and 5 from ICRISAT were tested for seed resistance using the toxigenic *A. flavus* strain AF 8-3-2A. Seeds had been stored for 8 weeks at room temperature.

#### Trial with 1979 seed to examine effects of length of storage.

Seed of 7 cultivars from the 1979 ICRISAT rainy season crop were tested for seed resistance after 55, 70 and

90 days of storage, using the toxigenic *A. flavus* strain AF 8-3-2A.

#### Trial with 1979 seed to examine effects of different *A. flavus* strains.

Seeds of 7 cultivars from the 1979 ICRISAT rainy season crop were tested for resistance of seed to 3 different toxigenic strains of *A. flavus* (AF 8-3-2A ; AF 8-2 ; NRRL 3000). Seeds had been stored for 8 weeks.

## RESULTS AND DISCUSSION

Results of the seed resistance trial with 1978 rainy season seed are presented in Table II. A commercial groundnut cultivar J 11 was found resistant to seed invasion and

TABLE II. — Dry seed resistance to invasion by *A. flavus* tests on 1978 seed using toxigenic strain AF 8-3-2A

(Tests de résistance des graines sèches à l'invasion par *A. flavus* sur des graines de la récolte de 1978 avec la souche toxigène AF 8-3-2A)

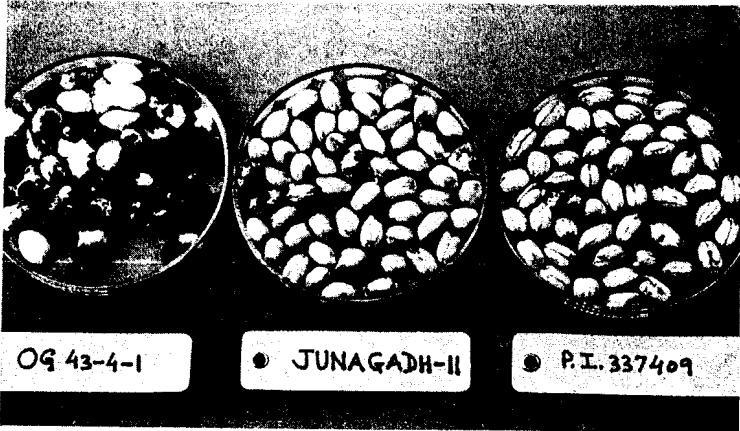
Cultivars	Mean percentages of seed colonised by <i>A. flavus</i> (Pourcentages moyens de graines colonisées par <i>A. flavus</i> )	
	Uninoculated (Non inoculées)	Inoculated (Inoculées)
<b>Seeds from (Graines de) Gujarat</b>		
J 11	0.0	14.8
Samrala	1.0	32.8
<b>Seeds from (Graines de) ICRISAT</b>		
Asiriya Mwitunde	1.9	27.3
Florunner	0.0	32.8
EC 76446(292)	2.0	45.9
US 26	2.4	63.1
OG 43-4-1	4.0	93.2
LSD ( <i>p.p.d.s.</i> ) (at 5 p. 100)		5.93

colonisation by the toxigenic strain AF 8-3-2A. Two cultivars US 26 and Asiriya Mwitunde, earlier reported as resistant to aflatoxin production [Rao and Tulpule, 1967 ; Kulkarni *et al.*, 1967] were found to be highly susceptible and moderately resistant, respectively. However, both the cultivar have been reported susceptible to seed colonisation [Mixon and Rogers, 1973] and to aflatoxin production by toxigenic strains of *A. flavus* [Doupnik, 1969 ; Aujla *et al.*, 1978]. Zambettakis *et al.* [1977] reported US 26 to be resistant (below 20 p. 100 seed infection) to a mixture of 4 toxigenic strains of *A. flavus*. This might be attributed to competition for infection among the 4 strains used. Bell and Doupnik [1971] observed that double isolate inoculation of nil-high, low-high, and medium-pairs of isolates produced less aflatoxins in groundnut seeds than single-isolate inoculations ; however, one isolate did not completely suppress the infection by another under conditions favourable for the growth of the fungus. Another line EC 76446 (292), although resistant to rust and late leafspot [Subrahmanyam *et al.*, 1980], was observed to be susceptible to invasion and colonisation by *A. flavus*. Intrinsic natural infection in this line was also high compared to other cultivars (Table II).

Table III presents the data on the percentage of the seed colonised by toxigenic strain (AF 8-3-2A) of *A. flavus* for

7 cultivars tested at different time (55, 70 and 90 days after storage). The maximum resistance to seed colonisation was found in two lines, PI 337409 and PI 337394F, followed by J 11. However, the three lines did not differ significantly from each other. In these cultivars very little growth and sporulation of the fungus was observed in colonised seeds as compared to that in other cultivars (Fig. 1). Similar results have been reported for these two breeding lines by others [Mixon and Rogers, 1973 ; Zambettakis *et al.*, 1977]. There were no significant differences between the storage periods (Table III). Two lines, EC 76446 (292) and PI 259747, and a commercial cultivar TMV 2 were found susceptible. The cultivar OG 43-4-1 again showed high susceptibility. Further comparison of seed colonisation (Table IV) by three toxigenic strains confirmed the resistance in the two breeding lines, PI 337394F and PI 337409 and in J 11. Similar results for PI 337394F and PI 337409 have been reported in the U.S.A. [Mixon and Rogers, 1973] and in Senegal [Zambettakis *et al.*, 1977]. There were marked differences between the strains in regard to invasive potential in different cultivars. Strain NRRL 3000 proved less virulent to seeds of all the cultivars (Table IV). This may be attributed to the inherent ability of the strain. Some differences were observed between the cultivars in natural seed infection

FIG. 1.



Highly susceptible cultivar (*très sensible*) :  
OG 43-4-1

Resistant cultivars (*résistants*) :  
Junagadh-11 (J11)  
& PI 337409

TABLE III. — Dry seed resistance to invasion by *Aspergillus flavus* tests on 1979 seed using toxigenic strain AF 8-3-2A, seeds stored for three different periods

(Tests de résistance des graines sèches à l'invasion par *A. flavus* sur des graines de la récolte de 1979, avec la souche toxigène AF 8-3-2A ; les graines ont été stockées pendant 3 périodes différentes)

Cultivars	Seed stored before test for (days) : (Graines testées après stockage pendant — jours) :						Mean (Moyenne)	
	55		70		90			
	Mean percentage of seeds colonised by <i>A. flavus</i> (Pourcentage moyen de graines colonisées par <i>A. flavus</i> )							
	US (a)	IS (b)	US	IS	US	IS	US	IS
PI 337409	0.0	9.1	0.0	9.5	0.0	6.3	0.0	8.3
PI 337394F	0.0	10.6	0.0	9.7	0.0	7.0	0.0	9.1
J 11	0.0	11.5	0.0	12.0	0.0	12.1	0.0	11.9
EC 76446(292)	2.1	28.1	2.2	26.6	2.0	36.1	2.1	30.3
PI 259747	2.1	30.7	2.3	37.4	2.1	28.1	2.2	32.1
TMV-2	0.0	43.2	0.0	41.3	0.0	33.8	0.0	39.4
OG 43-4-1	4.8	96.2	4.9	98.4	2.5	95.9	4.1	97.5
Mean (Moyenne)	US 1.3		1.3		0.9		1.2	
	IS	33.0		33.6		31.3		32.6

For inoculated seeds (IS) (Pour les graines inoculées) :

— Comparison between cultivars (Comparaison entre les cultivars) :

LSD (*p.p.d.s.*) (at 5 p. 100)

— Comparison between storage periods (Comparaison entre les périodes de stockage) :

3.07

— Interactions between cultivars and storage periods (Interactions entre les cultivars et les périodes de stockage) :

N.S.

5.31

(a) US = Uninoculated seeds (graines non inoculées).

(b) IS = Inoculated seeds (graines inoculées).

TABLE IV. — Dry seed resistance to invasion by *Aspergillus flavus* tests on 1979 seed using 3 toxigenic strains

(Tests de résistance des graines sèches à l'invasion par *A. flavus* sur des graines de la récolte de 1979, avec 3 souches toxigènes)

Cultivars	Mean percentages of seeds colonised by <i>A. flavus</i> (Pourcentages moyens de graines colonisées par <i>A. flavus</i> )						Mean (Moyenne)	
	AF 8-3-2A		AF 8-2		NRRL 3000			
	US (a)	IS (b)	US	IS	US	IS	US	IS
PI 337394F	0.0	9.1	0.0	7.2	0.0	5.3	0.0	7.2
PI 337409	0.0	9.1	0.0	8.7	0.0	6.1	0.0	8.0
J 11	0.0	11.6	0.0	10.0	0.0	9.1	0.0	10.3
TMV 2	0.0	31.5	0.0	29.0	0.0	24.5	0.0	28.4
PI 259747	2.1	31.6	2.1	30.4	1.4	27.0	1.9	29.7
EC 76446(292)	2.3	36.9	2.2	36.6	1.9	27.4	2.1	33.7
OG 43-4-1	2.9	96.0	3.4	96.8	2.6	89.6	3.0	94.1
Mean (Moyenne)	US 1.0		1.1		0.8		1.0	
	IS	32.3		31.3		27.0		30.2

For inoculated seeds (IS) (Pour les graines inoculées) :

— Comparison between cultivars (Comparaison entre les cultivars) :

LSD (*p.p.d.s.*) (at 5 p. 100)

— Comparison between strains (Comparaison entre les souches) :

1.27

— Interactions between cultivars and strains (Interactions entre les cultivars et les souches) :

0.83

2.20

(a) US = Uninoculated seeds (graines non inoculées).

(b) IS = Inoculated seeds (graines inoculées).

(Tables II, III, IV). Cultivars J 11, PI 337394F and PI 337409 were free of natural *A. flavus* infection. Other cultivars showed from 2 to 4 percent natural seed infection. Similar results have been reported by Zambettakis *et al.* [1977].

The resistant breeding lines, PI 337409 and PI 337394F, are already extensively used in breeding programmes at ICRISAT and in the U.S.A. to develop desirable commercial cultivars with resistance to *A. flavus*. Some progress has been made in developing agronomically acceptable groundnut cultivars with resistance to seed colonisation by *A. flavus* [Mixon, 1979]. In the present studies we recorded a high degree of resistance in a commercial Spanish variety J 11. Resistance in J 11 was confirmed in a number of tests (Tables II, III, IV) and it was comparable to that of the two breeding lines.

It is expected that the resistance exhibited by these cultivars might be extremely valuable under conditions of poor storage and unfavourable drying conditions in the field, however, there is no evidence that the cultivars with

dry seed resistance also possess any marked resistance to pod or seed invasion while the crop is in the ground or during the post harvest drying period. Research in this area is obviously closely linked with research into pod diseases. Pod rotting fungi, which damage but not always destroy the pods, may facilitate invasion of seeds by *A. flavus* [Ashworth and Langley, 1964]. At ICRISAT Centre, a number of cultivars including J 11 have been found with marked resistance to pod rots [Mehan, unpublished data]. Preliminary observations have indicated that this cultivar may have resistance to termite attack [P. W. Amin, personal communication]. The cultivar has also been reported resistant to aflatoxin production by a number of highly toxigenic strains of *A. flavus* and *A. parasiticus* [Tulpule *et al.*, 1977]. J 11 yields well and has a high oil content [Gopani and Vaishnai, 1970]. In view of these desirable attributes, it is suggested that such a variety could be grown in regions where aflatoxin contamination is a serious problem. It would be highly desirable to involve J 11 in the hybridization programme for developing high yielding *A. flavus* resistant varieties.

## REFERENCES

- [1] ASHWORTH L. J. and LANGLEY B. C. (1964). — The relationship of pod damage to kernel damage by moulds in Spanish peanuts. *Plant Dis. Repr.*, 48, p. 875-878.
- ✓[2] AUJLA S. S., CHOCHAN J. S. and MEHAN V. K. (1978). — The screening of peanut varieties for the accumulation of aflatoxin and their relative reaction to the toxigenic isolate of *Aspergillus flavus* Link ex-Fries. *Punjab Agricultural University J. Res.*, 15, p. 400-403.
- [3] AUSTWICK P. K. S. and AYERST G. (1963). — Toxic products in groundnuts. Groundnut microflora and toxicity. *Chem. Ind.*, 2, p. 55-61.
- [4] BELL D. K. and DOUPNIK B. (1971). — Infection of groundnut pods by isolates of *Aspergillus flavus* with different aflatoxin producing potentials. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57, p. 166-169.
- [5] DIENER U. L., JACKSON C. R., COOPER W. E., STRIPES R. J. and DAVIS N. D. (1969). — Invasion of peanut pods in the soil by *Aspergillus flavus*. *Plant Dis. Repr.*, 49, p. 931-935.
- [6] DOUPNIK B. (1969). — Aflatoxin produced on peanut varieties reported to inhibit production. *Phytopathology*, 59, p. 1554.
- [7] GOPANI D. D. and VAISHNAI N. L. (1970). — Two mutant forms of groundnut. *Indian J. Agric. Sci.*, 40, p. 431.
- [8] KULKARNI I. G., SHARIEF Y. and SARMA V. S. (1967). — « Asiriya Mwitunde » groundnut gives good results in Hyderabad. *Indian Farming*, 17, p. 11-12.
- [9] LAPRADE J. C. and BARTZ J. A. (1972). — Mechanical resistance of selected genotypes of dried peanuts to colonisation by strains of aflatoxin producing *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 62, p. 771.
- ✓[10] MAZZANI B. and HINOJOSA S. (1961). — Diferencias varietales de susceptibilidad a la roya del mani en Venezuela. *Agron. trop.*, 11, p. 41.
- [11] McDONALD D. and HARKNESS C. (1963). — Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts. Part II. *Trop. Sci.*, 5, p. 143-154.
- [12] MEHAN V. K. and McDONALD D. (1980). — Screening for resistance to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin production in groundnuts. ICRISAT Groundnut Improvement Program Occasional Paper-2, p. 1-15.
- [13] MIXON A. C. (1979). — Developing groundnut lines with resistance to seed colonisation by toxin producing strains of *Aspergillus* species. *PANS*, 25, p. 394-400.
- [14] MIXON A. C. and ROGERS K. M. (1973). — Peanut accessions resistant to seed infection by *Aspergillus flavus*. *Agron. J.*, 65, p. 560-562.
- [15] RAO K. S. and TULPUL P. G. (1967). — Varietal differences of groundnut in the production of aflatoxin. *Nature*, 214, p. 738-739.
- [16] STOLOFF L. (1977). — In: *Mycotoxins in human and animal health* (eds. Rodricks J., Hesseltine C. W., and Mehlman M. A.), Pathotox Publishers, Inc. (1977), 7.
- [17] SUBRAHMANYAM P., MEHAN V. K., NEVILL D. J. and McDONALD D. (1980). — Research on fungal diseases of groundnut at ICRISAT. *Proc. International Groundnut Workshop*, ICRISAT, Patancheru P.O. A.P. 502324, India, 13-17 oct., 1980.
- [18] TULPUL P. G., BHAT R. V. and NAGARAJAN V. (1977). — Variations in aflatoxin production due to fungal isolates and crop genotypes and their scope in prevention of aflatoxin production. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 54, p. 487-493.
- [19] ZAMBETTAKIS Ch., BOCKELE-MORVAN A., WALIYAR F. and ROSSION J. (1977). — Diferencias varietales de sensibilidad de la arachide a la contaminación por *A. flavus* aux champs et en conditions artificielles. *Oléagineux*, 32, p. 377-385.

## RÉSUMÉ

### Cultivars d'arachide avec graines résistantes à l'invasion par *Aspergillus flavus*

V. K. MEHAN, D. McDONALD, S. N. NIGAM et B. LALITHA, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 10, p. 501-507.

Un cultivar commercial indien J11 et deux lignées d'arachide PI 337409 et PI 337394 F, dont les graines sèches et intactes étaient résistantes à l'invasion et à la colonisation par *Aspergillus flavus* lorsqu'on les réhydratait et les inoculait avec des souches locales du champignon, ont été mis en évidence. Le stockage des graines pendant 55, 70, et 90 jours avant le test n'a pas eu d'incidence significative sur les résultats. L'inoculation des graines de sept cultivars avec trois lignées toxigènes de *Aspergillus flavus*, a permis d'observer des différences sensibles dans la sensibilité des cultivars. La lignée NRRL 3000 de *A. flavus* est moins virulente que les deux autres sur tous les cultivars d'arachide. Le cultivar J11, qui manifeste également une résistance aux pourritures des gous-ses, pourrait être utilisé dans les zones où la contamination par l'aflatoxine est un problème important.

## RESUMEN

### Cultivares de mani de semillas resistentes a la invasion por *Aspergillus flavus*

V. K. MEHAN, D. McDONALD, S. N. NIGAM y B. LALITHA, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 10, p. 501-507.

Se evidencio un cultivar comercial indico J11 y dos líneas de mani PI 337409 y PI 337394 F, cuyas semillas secas e intactas eran resistentes a la invasion y colonización por *Aspergillus flavus* cuando se las rehidrataba y se les inoculaba cepas locales del hongo. El almacenamiento de semillas durante 55, 70 y 90 días antes de la prueba no ha tenido incidencia significativa en los resultados. La inoculación de las semillas de siete cultivares con tres líneas toxigenas de *Aspergillus flavus*, permitió observar diferencias notables en la sensibilidad de los cultivares. La línea NRRL 3000 de *A. flavus* es menos virulenta que las otras dos en todos los cultivares de mani. El cultivar J11, que también manifiesta una resistencia a la pudrición de las vainas, podría utilizarse en las zonas en que la contaminación por la aflatoxina plantea un problema importante.

# Cultivars d'arachide avec graines résistantes à l'invasion par *Aspergillus flavus* (1)

V. K. MEHAN, D. McDONALD, S. N. NIGAM et B. LALITHA (2)

## INTRODUCTION

La contamination des graines d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) par les aflatoxines est un grave problème dans de nombreux pays. Les aflatoxines qui sont produites par plusieurs souches de *A. flavus* Link ex-Fr., se sont révélées toxiques et cancérogènes pour plusieurs espèces d'animaux et constituent un réel danger pour la santé humaine. Dans les pays producteurs d'arachide ayant une agriculture évoluée tels que les Etats-Unis, il a été possible de réduire le taux d'aflatoxine dans les produits récoltés en respectant certaines méthodes recommandées de culture, de récolte, de séchage et de stockage qui limitent l'invasion par *A. flavus* et la production d'aflatoxine. Toutefois, le niveau élevé de contamination constaté semble montrer que les cultivateurs des pays en développement n'ont pas encore adopté ces recommandations [Stoloff, 1977]. D'autres façons possibles d'éviter la contamination ont été envisagées et l'une de celles-ci est l'utilisation de la résistance génétique.

Les arachides peuvent être envahies par *A. flavus* avant la récolte, pendant le séchage ou pendant le stockage si le produit est humide [Austwick et Ayerst, 1963 ; Diener *et al.*, 1969 ; McDonald et Harkness, 1963]. On ne signale pas de différences significatives variétales pour la résistance à l'invasion par *A. flavus* avant la récolte ou pendant le séchage des graines, mais des différences ont été mises en évidence pour les graines sèches en cours de stockage [Laprade et Bartz, 1972 ; Mixon et Rogers, 1973]. Cet article fait état du choix de certains cultivars ou lignées pour leur résistance à l'invasion des graines par *A. flavus*.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Provenance des graines.

Les graines des cultivars à tester proviennent des récoltes 1978 du Centre de l'ICRISAT et de l'Université Agricole du Gujarat, Junagadh (Etat de Gujarat) et de la récolte 1979 du Centre de l'ICRISAT. Les arachides se sont développées au moment de la saison des pluies et n'ont pas subi le choc de la sécheresse. Les cultivars ont été récoltés à maturité optimale, séchés pendant 3 jours en andains, triés à la main, et les gousses ont été séchées au soleil sur des nattes jusqu'à ce que l'humidité des graines soit inférieure à 7 p. 100. Les gousses ont été ensuite stockées dans des sacs fermés au laboratoire jusqu'à ce qu'elles soient utilisées pour les tests. Les cultivars utilisés sont décrits dans le tableau I.

### Les souches d'*Aspergillus flavus*.

Trois souches de *A. flavus* ont été utilisées dans des expériences variées, AF 8-3-2A et AF 8-2 qui produisent de l'aflatoxine B<sub>1</sub> et NRRL 3000 qui produit les aflatoxines B<sub>1</sub> et G<sub>1</sub> [Mehan, données non publiées]. Les lignées ont été cultivées sur un milieu d'Agar Czapek Dox. Les conidies ont été récoltées, à partir de cultures de 8 jours, en les inondant avec de l'eau distillée et stérilisée contenant 5 p. 100 (v/v) de Tween 20 et en grattant délicatement la surface de la culture avec une aiguille stérile pour les déloger. La suspension conidiale contenait  $4 \times 10^6$  conidies/ml.

### Tests de résistance.

La méthode utilisée est celle décrite par Mixon et Rogers [1973] avec quelques modifications dont le détail a été donné plus tard [Mehan et McDonald, 1980]. Seules des graines intactes, mûres et de belle taille extraites avec soin des gousses intactes et propres, ont été utilisées pour les tests. Chaque échantillon contenant environ 20 g de graines stérilisées en surface avec 0,1 p. 100 de chlorure mercurique a été placé dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre et de l'eau distillée et stérile a été ajoutée sur les graines jusqu'à atteinte d'un niveau d'humidité de 20 p. 100. Sur chaque échantillon, 1 ml de suspension conidiale a été ajouté et la boîte agitée délicatement afin de disperser la suspension sur toute la surface des graines. Des échantillons similaires ont été traités de la même façon, mis à part que la suspension conidiale a été remplacée par de l'eau distillée et stérile. Toutes les boîtes ont été mises à incuber à la température de 25 °C pendant 8 jours. La présence de *A. flavus* sur des graines en cours de sporulation a été enregistrée et le pourcentage des graines colonisées noté. Les cultivars ayant moins de 15 p. 100 de graines touchées ont été considérés comme résistants à l'invasion et à la colonisation par *A. flavus*, ceux colonisés à 16-30 p. 100 ont été considérés comme peu résistants, ceux colonisés à 31-50 p. 100 comme sensibles, et ceux colonisés à plus de 50 p. 100 très sensibles [Mehan et McDonald, 1980].

Pour chaque cultivar, dans tous les essais, trois échantillons ont été testés pour l'invasion par *A. flavus* et deux échantillons non inoculés ont été mis à incuber pour obtenir une mesure de l'infestation naturelle. Les graines inoculées en 1979 ont été analysées selon un schéma factoriel à deux facteurs.

### Essais des graines de la saison des pluies 1978.

On a testé la résistance des graines des 2 cultivars venant de Junagadh et des graines de 5 cultivars venant de l'ICRISAT, en utilisant la souche toxigène de *A. flavus* AF 8-3-2A. Ces graines ont été stockées pendant 8 semaines à la température ambiante.

### Essais sur des graines de 1979 pour l'étude de l'influence de la durée du stockage.

On a testé la résistance des 7 cultivars provenant de la récolte de l'ICRISAT de la saison des pluies de 1979, avec 3 souches toxigènes différentes de *A. flavus* (AF 8-3-2A, AF 8-2, NRRL 3000). Les graines ont été stockées pendant 8 semaines.

## RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

Les résultats des essais sur la résistance des graines de la récolte de la saison des pluies de 1978, sont présentés dans le tableau II. Le cultivar d'arachide commercial J 11 s'est montré résistant à l'invasion et à la colonisation par la souche toxigène AF 8-3-2A. Des deux cultivars US 26 et Asiriya Mwitunde, dont le premier a été considéré comme résistant à la production d'aflatoxine [Rao et Tulpule, 1967 ; Kulkarni *et al.*, 1967], l'un US 26 s'est montré très sensible, tandis que l'autre était modérément résistant. Toutefois, ces deux cultivars ont été signalés sensibles à la colonisation des graines par *A. flavus* [Mixon et Rogers, 1973] et à la production d'aflatoxine par les souches toxigènes de *A. flavus* [Doupnik, 1969 ; Aujla *et al.*, 1978]. Zambettakis *et al.* [1977] considèrent US 26 comme résistant (en dessous de 20 p. 100 de graines infestées) à un mélange de quatre souches toxigènes de *A. flavus*. Cela peut être dû à la compétition pour l'infestation des quatre souches utilisées. Bell et Doupnik [1971] ont observé qu'une inoculation à partir de deux isolats : nul-fort, faible et fort, moyen et moyen,

(1) Proposé comme article N° 167 par l'International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) (\*).

(2) Groundnut Improvement Program, ICRISAT (\*).

(\*) ICRISAT, Patancheru P.O. A.P. 502324 (India).

produit moins d'aflatoxine dans les graines d'arachide que les inoculations à partir d'un isolat simple. De toute façon, un isolat ne supprime pas complètement la contamination par d'autres souches dans des conditions favorables à la croissance du champignon. Une autre lignée EC 76446 (292) bien que résistante à la rouille et à la cercosporiose tardive [Subrahmanyam *et al.*, 1980] s'est montrée sensible à l'invasion et à la colonisation par *A. flavus*. L'infestation naturelle intrinsèque de cette lignée est aussi importante que celle des autres cultivars (Tabl. II).

Le tableau III indique le pourcentage de graines envahies par la souche toxigène (AF 8-3-2A) de *A. flavus* pour les 7 cultivars testés à différents stades (55, 70 et 90 jours après le stockage). Une résistance maximale des graines à la colonisation a été trouvée dans les deux lignées, PI 337409 et PI 337394F suivies de J 11. De toute façon, ces trois lignées ne diffèrent pas significativement les unes des autres. Pour ces cultivars, on a pu noter une croissance et une sporulation très lentes des graines colonisées, comparativement aux autres cultivars (Fig. 1). Des résultats similaires ont été trouvés, pour ces deux lignées précitées, par d'autres auteurs [Mixon et Rogers, 1973; Zambettakis *et al.*, 1977]. Il n'y a eu aucune différence significative entre les périodes de stockage (Tabl. III). Deux lignées, EC 76446 (292) et PI 259747 et un cultivar commercial TMV2 ont été trouvés sensibles, et à nouveau le cultivar OG-43-4-1 a fait preuve d'une grande sensibilité. Par ailleurs, la comparaison des graines colonisées (Tabl. IV) par trois souches toxigènes a confirmé la résistance des deux lignées, PI 337394F et PI 337409 et de J 11. Des résultats similaires pour PI 337394F et PI 337409 ont été notés aux Etats-Unis [Mixon et Rogers, 1973] et au Sénégal [Zambettakis *et al.*, 1977]. Des différences entre les lignées ont été relevées. La souche NRRL 3000 est moins virulente pour les graines de tous les cultivars (Tabl. IV). Cela peut être attribué au pouvoir inhérent de la lignée. Quelques différences ont été observées entre les cultivars dans l'infestation naturelle des graines (Tabl. II, III, IV). Les cultivars J 11, PI 337394F et PI 337409 étaient exempts d'infestation naturelle par *A. flavus*. D'autres cultivars ont manifesté une infestation naturelle des graines de 2 à 4 p. 100. Des résultats similaires ont

été trouvés par Zambettakis *et al.* [1977].

Les lignées résistantes, PI 337409 et PI 337394F sont toujours largement utilisées dans les programmes de croisement de l'ICRISAT et aux Etats-Unis pour obtenir des cultivars commerciaux résistants à *A. flavus*. De grands progrès ont été faits dans le développement de cultivars d'arachide résistants à la colonisation des graines par *A. flavus*, ayant des caractéristiques agronomiques acceptables [Mixon, 1979]. Dans la présente étude il a été mis en évidence un haut degré de résistance de la variété Spanish J 11 commerciale. Cette résistance de J 11 a été confirmée par un certain nombre de tests (Tabl. II, III, IV) et s'est révélée comparable à celle des deux lignées précitées.

On peut s'attendre à ce que la résistance exprimée par ces cultivars puisse être tout à fait valable dans de mauvaises conditions de stockage et de séchage au champ. Cependant, il n'est pas évident que les cultivars manifestant une résistance sur des graines sèches possèdent aussi une résistance notable à l'invasion des gousses et des graines alors que celles-ci sont encore dans le sol ou durant la période de séchage après la récolte. La recherche dans cette voie est évidemment étroitement liée à celle des maladies des gousses. Les champignons responsables de la pourriture des gousses, qui endommagent mais ne détruisent pas toujours les gousses, peuvent faciliter l'invasion des graines par *A. flavus* [Ashworth et Langley, 1964]. On a trouvé, au Centre de l'ICRISAT, un certain nombre de cultivars, dont J 11, ayant une résistance notable aux pourritures des gousses [Mehan, données non publiées]. Des observations préliminaires ont indiqué que ce cultivar peut être résistant à l'attaque des termites [P. W. Amin, communication personnelle], il est également résistant à la production d'aflatoxine par un grand nombre de souches toxigènes de *A. flavus* et de *A. parasiticus* [Tulpule *et al.*, 1977]. J 11 a un bon rendement et une haute teneur en huile [Gopani et Vaishnai, 1970]. Dans ces conditions, on peut admettre qu'une telle variété puisse être cultivée dans des régions où la contamination par l'aflatoxine est un grave problème. Il serait grandement désirable d'introduire J 11 dans le programme d'hybridation pour l'obtention de variétés résistantes à *A. flavus* avec un haut rendement.

